

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

①1 N° de publication : 2 781 674  
(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

②1 N° d'enregistrement national : 98 09886

⑤1 Int Cl<sup>7</sup> : A 61 K 33/36, A 61 K 38/21, 38/48, A 61 P 35/00

①2

## DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 31.07.98.

③0 Priorité :

④3 Date de mise à la disposition du public de la  
demande : 04.02.00 Bulletin 00/05.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de  
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du  
présent fascicule*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux  
apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE  
ET DE LA RECHERCHE MEDICALE INSERM Etablis-  
sement public à caractère scientifique et technologique  
— FR et CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE CNRS — FR.

⑦2 Inventeur(s) : KOKEN MARCEL, QUIGNON  
FREDERIQUE, DE THE HUGUES, AMEISEN JEAN  
CLAUDE et DE BELS FREDERIC.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire(s) : CABINET LAVOIX.

⑤4 UTILISATION DE NOUVEAUX AGENTS INDUCTEURS DE MORT CELLULAIRE EN SYNERGIE AVEC LES  
INTERFERONS.

⑤7 La présente invention concerne l'utilisation de nou-  
veaux agents inducteurs de mort cellulaire, et en particulier  
d'un agent permettant la surexpression de la protéine PML  
sur les corps nucléaires, en association avec des interfé-  
rons, pour induire la mort de cellules indésirables.

FR 2 781 674 - A1



BEST AVAILABLE COPY

Copied from 10534992 on 11/07/2008

La présente invention concerne l'utilisation de nouveaux agents inducteurs de mort cellulaire, et en particulier d'un agent permettant la surexpression de la protéine PML sur les corps nucléaires, en association avec des interférons, pour induire la mort de cellules indésirables.

5 Les corps nucléaires sont des structures associées à la matrice nucléaire, de fonction inconnue, et qui contiennent un certain nombre de protéines incluant PML, Sp100, ISG20, PIC-1/SUMO-1, Isp100, PLZF, Int-6, CBP, Rb, RFP et la protéine P ribosomale (Lamond et al, 1998). Le gène codant pour la protéine PML (pour "ProMyelocytic Leukemia") a été identifié à partir de  
10 sa fusion avec le gène *RAR $\alpha$*  (récepteur nucléaire de l'acide rétinoïque) dans la translocation t(15;17) trouvée chez des patients atteints de leucémie promyélocytique aiguë ("Acute Promyelocytic Leukemia" - APL). Ce gène *PML* est un gène cible des interférons, et sa surexpression provoque un arrêt de la croissance de certaines lignées cellulaires (Koken et al, 1995). Dans les cellules  
15 malignes APL, la protéine PML n'est pas localisée sur les corps nucléaires mais délocalisée du fait de l'expression de PML-*RAR $\alpha$* . L'oxyde d'arsenic induit le retour de PML vers sa localisation normale ainsi que la mort de la cellule. Dans les cellules normales non APL, où la localisation de PML est normale, l'arsenic induit l'agrégation de PML vers de larges corps modifiés, mais le phénomène ne  
20 s'accompagne pas de mort cellulaire (Zhu et al, 1997).

Les auteurs de l'invention ont à présent découvert que la surexpression de la protéine PML localisée sur les corps nucléaires provoque la mort de la cellule, par un mécanisme original différent de celui de l'apoptose induite par les caspases.

25 La conséquence majeure de cette découverte est qu'une substance favorisant l'adressage de la protéine PML vers les corps cellulaires et/ou sa stabilisation, est particulièrement utile pour induire la mort de cellules indésirables.

Lesdites substances qui induisent l'adressage de la protéine PML  
30 vers les corps nucléaires et/ou sa stabilisation, peuvent être identifiées par des tests standard connus de l'homme du métier, la mesure du transit intracellulaire entre les fractions cytoplasmique et nucléoplasmique et la fraction associée aux corps nucléaires et la stabilisation de la protéine PML pouvant être notamment réalisée par Western Blot.

Lesdites cellules indésirables peuvent être notamment des cellules d'une tumeur, des cellules infectées par un virus, un parasite ou une bactérie, des cellules immunitaires participant à une réaction immunitaire inappropriée, des cellules génétiquement altérées, des cellules sénescents ou hyperplasiques

5 Par "tumeur", on entend toute prolifération cellulaire indésirable, bénigne ou maligne, incluant notamment les cancers solides et les leucémies et lymphomes. Parmi les tumeurs malignes, on peut citer en particulier les leucémies myéloïdes chroniques et les mélanomes.

10 La présente invention a donc pour objet l'utilisation d'au moins une substance favorisant l'adressage de la protéine PML vers les corps nucléaires et/ou sa stabilisation pour la fabrication d'un médicament destiné à induire la mort de cellules indésirables, à l'exception des cellules leucémiques de la leucémie promyélocytique aiguë lorsque ladite substance est un composé de l'arsenic.

15 L'expression de la protéine PML étant induite par des interférons, la présence d'interférons, qu'ils soient d'origine endogène ou administrés au patient de manière simultanée ou séquentielle, est nécessaire à l'efficacité du traitement envisagé.

20 De manière surprenante, les auteurs de la présente invention ont plus particulièrement découvert que le zVAD (benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp(O-méthyl)-fluorométhylcétone) d'une part stabilise la protéine PML et d'autre part accélère la mort cellulaire induite par les interférons.

25 Or, le zVAD est initialement connu comme inhibiteur des caspases, protéases impliquées dans le processus d'apoptose (Salvesen et al, 1997). Des études (Mc Carthy et al, 1997) ont en outre montré que le zVAD empêchait ou retardait fortement la mort cellulaire. La découverte des auteurs de la présente invention, selon laquelle le zVAD ne bloque pas la mort cellulaire induite par les interférons mais au contraire l'accélère, va donc à l'encontre des résultats que pouvait attendre l'homme du métier.

30 La présente invention a plus particulièrement pour objet l'utilisation d'un inhibiteur et/ou substrat de caspases, tel que le zVAD, pour la fabrication d'un médicament destiné à induire la mort de cellules indésirables.

Par « substrat de caspases », on entend tout composé capable de se lier aux caspases.

Les auteurs de la présente invention ont également découvert que l'arsenic, et plus particulièrement le trioxyde d'arsenic, d'une part favorise l'adressage de la protéine PML vers les corps cellulaires et d'autre part accélère la mort cellulaire induite par les interférons.

5 La présente invention a plus particulièrement pour objet l'utilisation d'un composé de l'arsenic ou d'un composé ayant les mêmes propriétés biologiques que l'arsenic pour la fabrication d'un médicament destiné à induire la mort de cellules indésirables, à l'exception des cellules leucémiques de la leucémie promyélocytique aiguë.

10 Parmi les composés de l'arsenic, on peut citer notamment le trioxyde d'arsenic.

Par « composé ayant les mêmes propriétés biologiques que l'arsenic », on entend tout composé qui, comme l'arsenic, est un inhibiteur de phosphatase et/ou est capable de créer des adduits covalents par liaison avec  
15 des groupements dithiols.

Les inhibiteurs et/ou substrats de caspases ou les composés de l'arsenic ou les composés ayant les mêmes propriétés biologiques que l'arsenic sont de préférence utilisés, pour induire la mort des cellules indésirables, en association avec la protéine PML, et/ou avec un agent induisant la surexpression  
20 de la protéine PML. Parmi les agents induisant la surexpression de la protéine PML, on utilise de préférence un interféron, tel que l'interféron  $\alpha$  ou  $\beta$ .

En effet les auteurs de la présente invention ont plus particulièrement découvert que les substrats de caspases, et en particulier le zVAD, ainsi que les composés de l'arsenic, en particulier le trioxyde d'arsenic,  
25 agissaient de manière synergique avec les interférons pour induire et accélérer la mort cellulaire.

L'administration de manière simultanée ou séquentielle de PML ou d'un agent induisant la surexpression de la protéine PML, tels que les interférons, peut être inutile si la quantité de PML ou d'agent induisant la surexpression de la  
30 protéine PML, tels que les interférons, d'origine endogène, est suffisante. Néanmoins, selon un mode préféré de réalisation de l'invention, l'administration d'une substance choisie parmi les composés de l'arsenic, les composés ayant les mêmes propriétés biologiques que l'arsenic et les inhibiteurs et/ou substrats des caspases, est associée à une administration simultanée ou séquentielle de

protéine PML, et/ou d'un agent induisant la surexpression de la protéine PML, tels que les interférons.

Fait partie de l'invention l'utilisation d'une substance choisie parmi les composés de l'arsenic, les composés ayant les mêmes propriétés biologiques que l'arsenic et les inhibiteurs et/ou substrats des caspases, en association avec un interféron, pour induire la mort de cellules indésirables, que celle-ci soit médiée par la protéine PML induite par ledit interféron ou par un autre mécanisme également induit par ledit interféron.

La présente invention a également pour objet une méthode de traitement thérapeutique, dans laquelle on administre à un patient nécessitant un tel traitement une quantité thérapeutiquement efficace d'au moins une substance choisie parmi les composés de l'arsenic, les composés ayant les mêmes propriétés biologiques que l'arsenic et les inhibiteurs et/ou substrats des caspases, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

De manière préférentielle on administre également audit patient une quantité thérapeutiquement efficace de protéine PML, et/ou d'un agent induisant la surexpression de la protéine PML, tel qu'un interféron, de manière simultanée ou séquentielle.

La présente invention a également pour objet une composition pharmaceutique contenant

1) soit au moins un inhibiteur et/ou substrat des caspases associé à :

- au moins un composé de l'arsenic ou un composé ayant les mêmes propriétés biologiques que l'arsenic;

- et/ou la protéine PML

- et/ou au moins un agent induisant la surexpression de la protéine PML, tel qu'un interféron;

en présence d'un véhicule pharmaceutiquement acceptable ;

2) soit au moins un composé de l'arsenic ou un composé ayant les mêmes propriétés biologiques que l'arsenic associé à la protéine PML et/ou à au moins un agent induisant la surexpression de la protéine PML, tel qu'un interféron, en présence d'un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

La présente invention a également pour objet une composition un kit comprenant

a) - une composition pharmaceutique (1) contenant au moins un inhibiteur et/ou substrat des caspases, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable ;

5 - et/ou une composition pharmaceutique (2) contenant au moins un composé de l'arsenic ou un composé ayant les mêmes propriétés que l'arsenic, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable ; et

b) - une composition pharmaceutique (3) contenant la protéine PML en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable ;

10 - et/ou une composition pharmaceutique (4) contenant au moins un agent induisant la surexpression de la protéine PML, tel qu'un interféron, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable ;

lesdites compositions pharmaceutiques étant destinées à une administration simultanée ou séquentielle.

15 Le mode d'administration et la posologie dépendent de l'affection traitée et de son stade d'avancement, ainsi que du poids, de l'âge et du sexe du patient.

Conformément à l'invention, la formulation des médicaments de l'invention permet une administration notamment par voie orale, anale, nasale, intra-musculaire, intra-dermique, sous-cutanée, ou intra-veineuse.

20 La dose d'administration envisagée peut être par exemple de 1 à 50 mg par jour, de préférence par voie intraveineuse, pour les composés de l'arsenic, de 1 à 250 mg par kg de poids corporel de substrats de caspases tels que le zVAD, et de 1 à 20 millions d'unités internationales (M UI), de préférence de 3 à 5 M UI, de préférence par voie intra-musculaire ou sous-cutanée, par jour  
25 ou tous les deux jours, pour l'interféron.

Les auteurs de l'invention ont en outre découvert que la mort cellulaire induite par la surexpression de la protéine PML localisée sur les corps nucléaires présente des caractéristiques différentes de l'apoptose induit par les caspases. Dans le cas de la mort cellulaire induite par la PML, on n'observe en  
30 particulier pas les caractéristiques morphologiques nucléaires typiques de l'apoptose, telles que la condensation de la chromatine et la fragmentation nucléaire.

De plus, alors que la mort cellulaire induite par les interférons seuls présente les caractéristiques de l'apoptose, les auteurs de la présente invention

ont observé que l'association synergique de zVAD avec les interférons fait disparaître ce phénotype apoptotique, la mort cellulaire présentant alors des caractéristiques différentes de celles de l'apoptose.

5 Une des conséquences majeures de cette découverte est la capacité des cellules indésirables tuées par le mécanisme induit par la PML de provoquer une réaction immunitaire contre des cellules indésirables similaires qui auraient échappé à la mort médiée par la protéine PML (Melcher et al, 1998, Nature Medicine, vol 4, n° 5, pp 581-587).

10 Cette propriété rend particulièrement intéressante l'utilisation d'une substance choisie parmi les composés de l'arsenic, les composés ayant les mêmes propriétés biologiques que l'arsenic, et les inhibiteurs et/ou substrats des caspases, de préférence en association avec un interféron, pour induire la mort de cellules indésirables, dans la mesure où ladite substance induit également une réaction immunitaire subséquente à l'encontre des cellules indésirables.

15 Elle peut également être mise à profit pour traiter *ex vivo* un ensemble de cellules susceptibles de contenir des cellules indésirables, avant administration à un patient, par exemple une préparation de moelle osseuse destinée à une greffe chez un patient leucémique, une telle préparation contenant généralement quelques cellules malignes résiduelles. Un tel traitement  
20 permet non seulement d'induire la mort des cellules indésirables contenues dans la préparation, mais encore de provoquer une réaction immunitaire dirigée contre les cellules indésirables présentes dans le corps du patient à qui la préparation cellulaire traitée est administrée.

25 La présente invention a donc également pour objet un procédé *in vitro* pour induire la mort de cellules indésirables comprenant la mise en contact de cellules indésirables avec une substance choisie parmi les composés de l'arsenic, les composés ayant les mêmes propriétés biologiques que l'arsenic, et les inhibiteurs et/ou substrats des caspases, ladite substance pouvant être de préférence associée à la protéine PML et/ou à un agent induisant la  
30 surexpression de la protéine PML, de préférence un interféron.

Les exemples et figures suivants illustrent l'invention sans en limiter la portée.

### LEGENDE DES FIGURES

- La figure 1A représente l'induction de la protéine PML de 90 kD dans un clone REF(T)PML, quatre heures après exposition à des concentrations variables de  $\text{ZnCl}_2$ .  
5
- La figure 1B représente une analyse par FACS de cellules REF(T)PML ou de cellules contrôle, quatre heures 30 après exposition à  $150 \mu\text{M}$  de  $\text{ZnCl}_2$ . Le panneau de gauche représente le contenu en ADN par rapport à la taille des cellules. Les panneaux de droite représentent le contenu en ADN en fonction de la fluorescence (TUNEL).  
10
- La figure 1C représente l'analyse cytométrique des cellules REF(T)PML traitées ou non avec du  $\text{ZnCl}_2$ , de l'étoposide, ou l'inhibiteur de caspase zVAD. Un marquage est effectué avec de l'Annexine V-FITC (panneau de gauche) ou de la Rhodamine 123 (panneau de droite). Le pourcentage en cellules apoptotiques est indiqué.  
15
- La figure 2A représente l'absence de clivage de la PARP lors de la mort cellulaire déclenchée par la PML. Les cellules ont été traitées avec  $150 \mu\text{M}$  de  $\text{ZnCl}_2$ , de l'étoposide ou du zVAD.  
20
- La figure 2B représente l'activité de la caspase CPP32 déterminée par coupure du DEVD-pNA dans des cellules REF(T) contrôle ou des cellules REF(T)PML. Les absorbances relatives de trois déterminations indépendantes sont présentées.
- La figure 3A montre la survie des monocytes traités avec  $1000 \text{ U/ml}$  d' $\text{IFN}\alpha$ . Une expérience représentative sur cinq est présentée. Les tests TUNEL démontrent que la diminution de la numération cellulaire est due à l'apoptose.  
25
- La figure 3B représente des histogrammes indiquant l'effet du zVAD ( $100 \mu\text{M}$ ) 24 heures après l'addition de celui-ci. Les valeurs moyennes  $\pm$  les écarts-type de 11 expériences sont présentées.  
30
- La figure 4A montre que le zVAD stabilise la protéine PML dans les cellules REF(T).



- La figure 4B montre que l'interféron  $\alpha$  (1 000 U/ml) induit la PML de rat dans les cellules REF(T)PML. Les flèches indiquent des isoformes distincts de la PML.

5

## EXEMPLES

### MATERIELS ET METHODES

10

#### - Construction plasmidique

15

Un fragment *SacI*-*Bgl*II (- 69, + 55 paires de base) du promoteur de la métallothionéine de souris a été inséré dans un plasmide pKS et a été fusionné avec un fragment *Bgl*II-*Bam*HI d'un ADNc de PML conduisant au plasmide pKSmMT-PML. Pour la fusion GFP-PML, le même fragment PML a été inséré dans le site *Bgl*II du vecteur pEGFP-1 (Clontech). Un vecteur rétroviral exprimant PML a été également construit par insertion d'un ADNc de pleine longueur de PML (de Thé et al, 1991) au site *Eco*RI de SR $\alpha$ tkneo (Muller et al, 1991).

#### - Culture cellulaire

20

25

30

Les cellules REF(T) et MEF(T) sont des fibroblastes embryonnaires de rats et de souris immortalisés par un vecteur d'expression SV40T. Les cellules REF(K1) sont immortalisés par un mutant SV40T qui ne lie pas Rb, et les cellules F111 sont des fibroblastes de rat 3T3 spontanément immortalisés. Pour des essais de clonogénicité, les cellules ont été transfectées avec 10  $\mu$ g de SR $\alpha$ tkneo-PML ou SR $\alpha$ tkneo sur des boîtes de culture de 10 cm de diamètre et sélectionnées par de la néomycine (500  $\mu$ g/ml). Pour obtenir des clones inductibles, un pool de cellules REF(T) a été co-transfecté avec le plasmide pKSmMt-PML et un vecteur de résistance à l'hygromycine (DSP-Hygro). Les colonies résistantes ont été examinées pour l'expression de la PML après quatre heures d'un traitement au  $\text{ZnCl}_2$  (150  $\mu$ M) et soumises à un deuxième cycle de clonage par dilution limite. Des clones CHO inductible ont été construits de manière similaire. Les monocytes ont été préparés selon la méthode d'Estaquier et al, 1997. L'étoposide (utilisé à 100  $\mu$ M pendant 16 à 24 heures) a été obtenu auprès de Biomol Research Laboratories, le zVAD (benzyloxycarbonyl-Val-Ala-

Asp fluorométhylcétone, utilisé à 250 µg/ml) est commercialisé chez Bachem et l'IFN $\alpha$  de rat chez Access BioMedical. L'interféron  $\alpha$  humain a été fourni par Schering-Plough. Les anticorps contre la protéine PML humaine sont décrits dans l'article de Daniel et al, 1993. Les expériences de Western Blot avec la protéine PML de rat endogène ont été réalisées avec l'anticorps monoclonal 5E10 qui détecte à la fois la PML de rat et la PML humaine.

La protéine Bax a été détectée en utilisant un sérum polyclonal de lapin purifié dirigé contre les acides aminés 80-98 (SC930 Santa Cruz). Un autre anticorps polyclonal de lapin dirigé contre un autre peptide (acide aminés 11-30) (FC 793 Santa Cruz) et un anticorps monoclonal Zymed ont donné des résultats similaires. La p27 kip a été détectée en utilisant un anticorps monoclonal (Transduction laboratories).

#### Evaluation de la mort cellulaire

Les cellules ont été traitées pendant 2 heures avec 150 µM de ZnCl<sub>2</sub> (sauf indications contraires) en présence ou l'absence de sérum de veau foetal inactivé par la chaleur, puis les cellules ont été lavées et incubées dans un milieu sans ZnCl<sub>2</sub>. Le test TUNEL a été réalisé selon les indications du fabricant (Boehringer Mannheim, kit de détection de la mort cellulaire *in situ*), à l'exception de l'étape de fixation (4 % de formaldéhyde dans du tampon phosphate EBS pendant 10 minutes). La teneur en ADN cellulaire a été évaluée par une incubation de 10 minutes dans de l'iodure de propidium à 50 µg/ml, en présence de Rnase A à 100 µg/ml à 4°C. L'analyse de l'expression de la phosphatidylsérine sur le feuillet externe des membranes cellulaires a été réalisée en utilisant un marquage Annexine-V-fluos (Boehringer Mannheim) et une perte de la polarité mitochondriale par Rhodamine 123 (Molecular probes) selon les instructions du fabricant. Les échantillons ont été analysés sur un analyseur FACScan (Lysis II software Becton Dickinson). Pour le clivage de substrat par les caspases, 5.10<sup>6</sup> cellules ont été lavées dans du tampon PBS, et incubées pendant une heure à 4°C dans 200 µl de tampon de lyse (10 mM Hepes, pH 7,4, 2 mM EDTA, 2 mM DTT, 0,1 % CHAPS). Après centrifugation, 20 µl de surnageant et 180 µl de tampon de réaction (100 mM Hepes, pH 7,4, 2 % de glycérol, 5 mM DTT, 0,5 mM EDTA, 50 µM DEVD-pNA (Biomol Research

Laboratories)) ont été mélangés et l'absorbance à 405 nm a été mesurée après quatre heures d'incubation à 37°C. L'anticorps polyclonal SA-252 anti-PARP est commercialisé chez Biomol Research Laboratories.

5

### **EXEMPLE 1 :**

#### **La PML induit une mort cellulaire indépendante du zVAD.**

La transfection d'un vecteur d'expression de la PML (pSG5-PML) dans différentes lignées cellulaires de fibroblastes a fortement diminué la formation de foyers. La protéine PML étant indétectable dans les clones obtenus à partir des cellules transfectées par la PML, ces résultats impliquent que la PML exerce un effet inhibiteur majeur soit sur le cycle cellulaire soit sur la survie des cellules. Pour comprendre le mécanisme à la base de cet effet, un pool de fibroblastes d'embryons de rat (REFs) transformés par SV40T a été transfecté avec un plasmide pKSmMT-PML, dans lequel l'expression de PML est sous le contrôle d'un promoteur de la métallothionéine de souris. Trois des clones résultant REF(T)PML ont été étudiés par la suite, tandis que trois clones REF(T) porteurs du vecteur vide ont été testés comme contrôle. La protéine PML a été détectée par Western Blot deux heures après exposition au  $\text{ZnCl}_2$  (expression détectable à partir de 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{ZnCl}_2$  et présentant un plateau à 150  $\mu\text{M}$  de  $\text{ZnCl}_2$ ) (figure 1A). L'expression de la PML a induit une mort cellulaire synchronisée de l'ensemble de la population cellulaire avec des cinétiques variant de 48 heures pour 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{ZnCl}_2$  à six heures pour 150  $\mu\text{M}$ . Dans les trois clones REF(T)PML, des modifications morphologiques ont été observées à partir de trois heures après induction avec 150  $\mu\text{M}$  de  $\text{ZnCl}_2$ . Les cellules s'arrondissent, avec un rétrécissement clair du cytoplasme (figure 1B), sont devenues positives dans un test TUNEL (figure 1B) puis se sont progressivement détachées de la boîte. Elles ont cependant gardé leur capacité à exclure le bleu trypan. Ces modifications ont été associées avec une teneur en ADN subG1 modeste (figure 1B), une externalisation de la phosphatidylserine membranaire (figure 1C) et une perte du potentiel transmembranaire mitochondrial (figure 1C). Tandis que des modifications similaires ont été observées dans l'apoptose induite

par l'agent génotoxique étoposide, elles n'ont jamais été trouvées dans les cellules contrôle REF(T) traitées avec  $\text{ZnCl}_2$  (figures 1B et C). Contrairement au traitement par l'étoposide, la mort cellulaire induite par la PML n'est pas associée avec des caractéristiques morphologiques nucléaires typiques de l'apoptose telles que la condensation de la chromatine et la fragmentation nucléaire, même tardives dans le processus de mort cellulaire. Malgré le clivage de l'ADN (sub-G1 positif (figure 1B) et perte de la viscosité de l'ADN), la mort cellulaire induite par la PML n'est pas associée avec une échelle de l'ADN internucléosomale, en conformité avec le faible signal positif du TUNEL (figure 1B).

#### Contrôles :

Comme les cellules REF(T) sont des lignées cellulaires transformées par SV40T, plusieurs expériences ont été réalisées pour exclure une contribution de l'oncogène « grand T » du virus SV40 à la mort cellulaire induite par la PML. Premièrement, l'expression de la PML n'a pas altéré l'expression ou la localisation de SV40T dans les cellules REF(T)PML ni n'a dégradé la p53 ou la libération de p53 à partir de l'oncogène « grand T » du virus SV40. Deuxièmement, dans les cellules HeLa ou CHO transfectées de manière transitoire avec soit une protéine de fusion GFP-PML ou du GFP seul, toutes les cellules GFP-PML positives se sont progressivement détachées de la boîte et sont mortes, contrairement aux cellules GFP positives contrôle. Troisièmement, dans les cellules CHO transfectées de manière stable avec le plasmide pKSmMT-PML, l'induction par le  $\text{ZnCl}_2$  a là encore conduit à la mort des clones exprimant la protéine PML. Enfin, dans les cellules REF exprimant un mutant thermosensible SV40T, la dégradation des SV40T à 39,5°C n'a pas affecté la mort cellulaire déclenchée par la PML.

L'induction de la mort cellulaire peut requérir une transcription *de novo* ou peut refléter le déclenchement de voies préexistantes. Les cellules REF(T)PML ont été tout d'abord incubées avec  $\text{ZnCl}_2$  et avec du cycloheximide pendant deux heures permettant ainsi la synthèse d'ARNm de PML, et non pas sa traduction. Les cellules ont ensuite été lavées et incubées avec de l'actinomycine D seule pour permettre la traduction de l'ARNm de PML mais pas la néosynthèse ARNm. Dans cette expérience, la mort cellulaire a été observée

de même qu'en absence d'inhibiteur, montrant que la transcription *de novo* n'est pas requise. Une mort induite par la PML ne nécessite pas et n'induit pas la transition vers la phase S du cycle cellulaire. En effet, la PML déclenche toujours la mort dans les cellules REF(T)PML qui ont été bloquées au stade G1/S par un traitement à l'aphidicoline. De plus, une exposition au BrdU à différents temps après induction par  $\text{ZnCl}_2$  a montré que la réplication de l'ADN n'était pas modifiée jusqu'à deux heures mais était arrêtée après trois heures et que la mort cellulaire était présente dans toutes les phases du cycle cellulaire (figure 1B).

10

**EXEMPLE 2 :**

**L'arsenic favorise la mort cellulaire déclenchée par la PML.**

Lorsque les cellules REF(T)PML ont été traitées avec du  $\text{ZnCl}_2$  et  $10^{-6}$  M d' $\text{As}_2\text{O}_3$ , une vive accélération dans les modifications morphologiques associées à la mort cellulaire a été observée. Le clivage de l'ADN déterminé par des tests TUNEL a augmenté de manière similaire (117 % de cellules positives pour le co-traitement avec  $\text{ZnCl}_2$  contre 45 % pour  $\text{ZnCl}_2$  seul, tandis que  $\text{As}_2\text{O}_3$  seul n'a induit aucune augmentation par rapport au niveau de base). Le fait que l'arsenic augmente l'induction de la mort cellulaire en parallèle à la localisation de la PML sur les corps nucléaires suggère que la localisation de la PML vers les corps nucléaires est importante pour la mort cellulaire.

20

**EXEMPLE 3 :**

25

**La mort déclenchée par la PML n'est pas associée à l'activation des caspases.**

Il est connu que l'exécution de la mort cellulaire programmée implique l'activation protéolytique de caspases qui induisent les changements phénotypiques de l'apoptose par clivage de protéines nucléaires et cytoplasmiques (Salvesen et al, 1997). L'inhibiteur de caspases zVAD qui bloque l'apoptose induite par l'étoposide, n'inhibe pas la mort cellulaire induite par la

30

PML (figure 1C) et même de manière paradoxale l'accélère (71 % de signal positif TUNEL avec du zVAD et du  $\text{ZnCl}_2$  contre 45 % avec du  $\text{ZnCl}_2$  seul). Ces observations impliquent que les exécutants sensibles à la zVAD ne sont pas requis pour la mort cellulaire induite par la PML. De plus, la CPP32 (caspase 3), la principale caspase impliquée dans l'apoptose, apparaît ne pas être activée durant la mort cellulaire induite par la PML, dans la mesure où, un de ses substrats, la PARP (poly(ADP-ribose)polymérase) reste non clivé (figure 2A). Contrairement à l'étoposide, aucun clivage significatif des substrats de la caspase colorimétrique, YVAD-pNa (caspase de classe 1, Boehringer Mannheim) et DEVD-pNA (caspase de classe 3, Boehringer Mannheim) après induction par la PML n'a pu être détecté (figure 2B).

#### **EXEMPLE 4 :**

**L'arsenic et le zVAD potentialisent la mort cellulaire induite par la PML et les Interférons.**

Des monocytes primaires exposés à l'interféron  $\alpha$  ont subi une mort cellulaire progressive qui a conduit à la disparition complète de la culture cellulaire après sept jours (figures 3A et 3B). Lors de l'addition de zVAD avec l'interféron  $\alpha$ , la mort de l'ensemble de la population cellulaire a été observée dans les 24 heures en l'absence de la fragmentation nucléaire et de la condensation de la chromatine observée avec l'interféron seul (figures 3A et 3B). Peu ou aucune mort cellulaire n'a été observée avec du zVAD seul pendant 20 jours dans la plupart des cultures primaires (8/11) (figures 3A et 3B). Dans trois cultures sur onze, le zVAD seul a induit la mort d'une partie de la culture après sept jours, ces résultats reflétant probablement une sécrétion endogène d'interféron. Des résultats similaires ont été obtenus avec d'autres inhibiteurs de caspase tel que le DEVD.

Le tableau ci-dessous représente la mort cellulaire évaluée par tunnel de cellules REF(T)PML traitées pendant deux jours avec 1 000 U/ml d'IFN $\alpha$  et  $10^{-6}$  M d'As $_2$ O $_3$  ou de zVAD.

	IFN $\alpha$	
	-	+
Contrôle	5 %	42 %
ZVAD	5 %	60 %
As <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	5,5 %	63 %

5

Dans les cellules REF(T), une synergie importante a été trouvée entre soit l'interféron  $\alpha$  et le zVAD, soit l'interféron  $\alpha$  et l'As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (42 % de signal positif TUNEL pour l'interféron  $\alpha$  seul, et 60 % et 63 % avec zVAD et arsenic respectivement).

10

Le zVAD a augmenté les niveaux d'expression de la PML (figure 4A) et l'arsenic a augmenté son association avec les corps nucléaires, alors que la quantité totale en PML a été diminuée. La similarité de la synergie du zVAD et de l'arsenic avec les morts cellulaires déclenchées par la PML et l'interféron suggère que la PML est impliquée par la mort cellulaire induite par l'interféron. De plus, l'interféron  $\alpha$  induit la mort cellulaire avec les mêmes cinétiques que le ZnCl<sub>2</sub> 50  $\mu$ M et les deux induisent des quantités similaires de protéine PML (figure 4B).

15

20

#### **EXEMPLE 5 :**

**La protéine PML entraîne les protéines Bax et p27 vers les corps nucléaires.**

Bax et p27 sont connus comme étant deux produits de gènes proapoptotiques. Le double marquage avec des anticorps anti-PML et anti-Bax a

25

montré un marquage cytoplasmique de la protéine Bax et la co-localisation des protéines Bax et PML nucléoplasmiques endogènes sur les corps nucléaires en utilisant trois anticorps différents dirigés contre des portions distinctes de Bax. La surexpression de PML ou PML/RAR $\alpha$  dans les cellules HeLa a induit le  
5 recrutement de Bax endogène sur les structures marquées par la PML, suggérant fortement un contact entre Bax et la PML. La microscopie immuno-électronique a démontré une association préférentielle de Bax sur la périphérie des corps nucléaires comme montré précédemment pour la PML. Pour s'assurer que le recrutement de Bax intervient aussi dans des cellules non transfectées,  
10 des cellules HeLa ont été traitées avec de l'interféron et/ou de l'arsenic qui induit à la fois l'expression de la PML et son ciblage vers les corps nucléaires. L'interféron seul a recruté Bax et induit la mort cellulaire. L'arsenic a favorisé à la fois le recrutement de Bax et la mort cellulaire. Comme la quantité totale en Bax ne varie pas, ces modifications résultent du recrutement de Bax sur les corps  
15 cellulaires.

Des observations pratiquement similaires ont été faites avec l'inhibiteur cdk p27/kip (cycline dependent kinase inhibitor), qui est partiellement associé aux corps nucléaires et recruté par un traitement IFN/arsenic. Les protéines Bax et p27 sont ainsi identifiées comme étant de nouveaux antigènes  
20 liés aux corps nucléaires impliqués dans l'induction de la mort cellulaire.



**REVENDEICATIONS**

1. Utilisation d'au moins une substance favorisant l'adressage de la  
5 protéine PML vers les corps nucléaires et/ou sa stabilisation pour la fabrication  
d'un médicament destiné à induire la mort de cellules indésirables, à l'exception  
des cellules leucémiques de la leucémie promyélocytique aiguë lorsque ladite  
substance est un composé de l'arsenic.

2. Utilisation d'au moins une substance choisie parmi les composés de  
10 l'arsenic, les composés ayant les mêmes propriétés biologiques que l'arsenic, et  
les inhibiteurs et/ou substrats des caspases, pour la fabrication d'un médicament  
destiné à induire la mort de cellules indésirables, à l'exception des cellules  
leucémiques de la leucémie promyélocytique aiguë lorsque ledit composé est un  
composé de l'arsenic.

15 3. Utilisation selon l'une des revendications 1 ou 2 dans laquelle ladite  
substance est associée à la protéine PML et/ou à un agent induisant la  
surexpression de la protéine PML,  
l'administration de ladite substance et l'administration de la protéine PML et/ou  
dudit agent induisant la surexpression de la protéine PML étant simultanées ou  
20 séquentielles.

4. Utilisation selon la revendication 3 dans laquelle ledit agent  
induisant la surexpression de la protéine PML est un interféron, tel que  
l'interféron  $\alpha$  ou  $\beta$ .

25 5. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, dans  
laquelle ladite substance est le trioxyde d'arsenic.

6. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, dans  
laquelle ladite substance est le zVAD.

30 7. Procédé *in vitro* pour induire la mort de cellules indésirables  
comprenant la mise en contact de cellules indésirables avec une substance  
choisie parmi les composés de l'arsenic, les composés ayant les mêmes  
propriétés biologiques que l'arsenic, et les inhibiteurs et/ou substrats des  
caspases.

8. Procédé selon la revendication 7 dans lequel ladite substance est associée à la protéine PML et/ou à un agent induisant la surexpression de la protéine PML, de préférence un interféron.

9. Composition pharmaceutique contenant

5 1) soit au moins un inhibiteur et/ou substrat des caspases associé à :

- au moins un composé de l'arsenic ou un composé ayant les mêmes propriétés biologiques que l'arsenic;

- et/ou la protéine PML

- et/ou au moins un agent induisant la surexpression de la protéine PML, tel qu'un interféron;

10 en présence d'un véhicule pharmaceutiquement acceptable ;

2) soit au moins un composé de l'arsenic ou un composé ayant les mêmes propriétés biologiques que l'arsenic associé à la protéine PML et/ou à au moins un agent induisant la surexpression de la protéine PML, tel qu'un interféron, en

15 présence d'un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

10. Kit comprenant

a) - une composition pharmaceutique (1) contenant au moins un inhibiteur et/ou substrat des caspases, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable ;

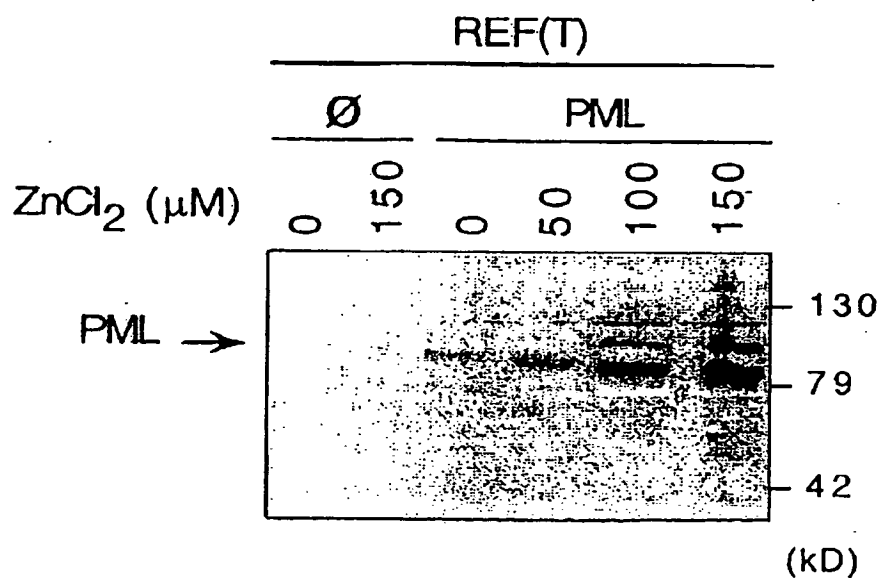
20 - et/ou une composition pharmaceutique (2) contenant au moins un composé de l'arsenic ou un composé ayant les mêmes propriétés que l'arsenic, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable ; et

b) - une composition pharmaceutique (3) contenant la protéine PML en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable;

25 - et/ou une composition pharmaceutique (4) contenant au moins un agent induisant la surexpression de la protéine PML, tel qu'un interféron, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable;

lesdites compositions pharmaceutiques étant destinées à une administration simultanée ou séquentielle.

30

FIG. 1A

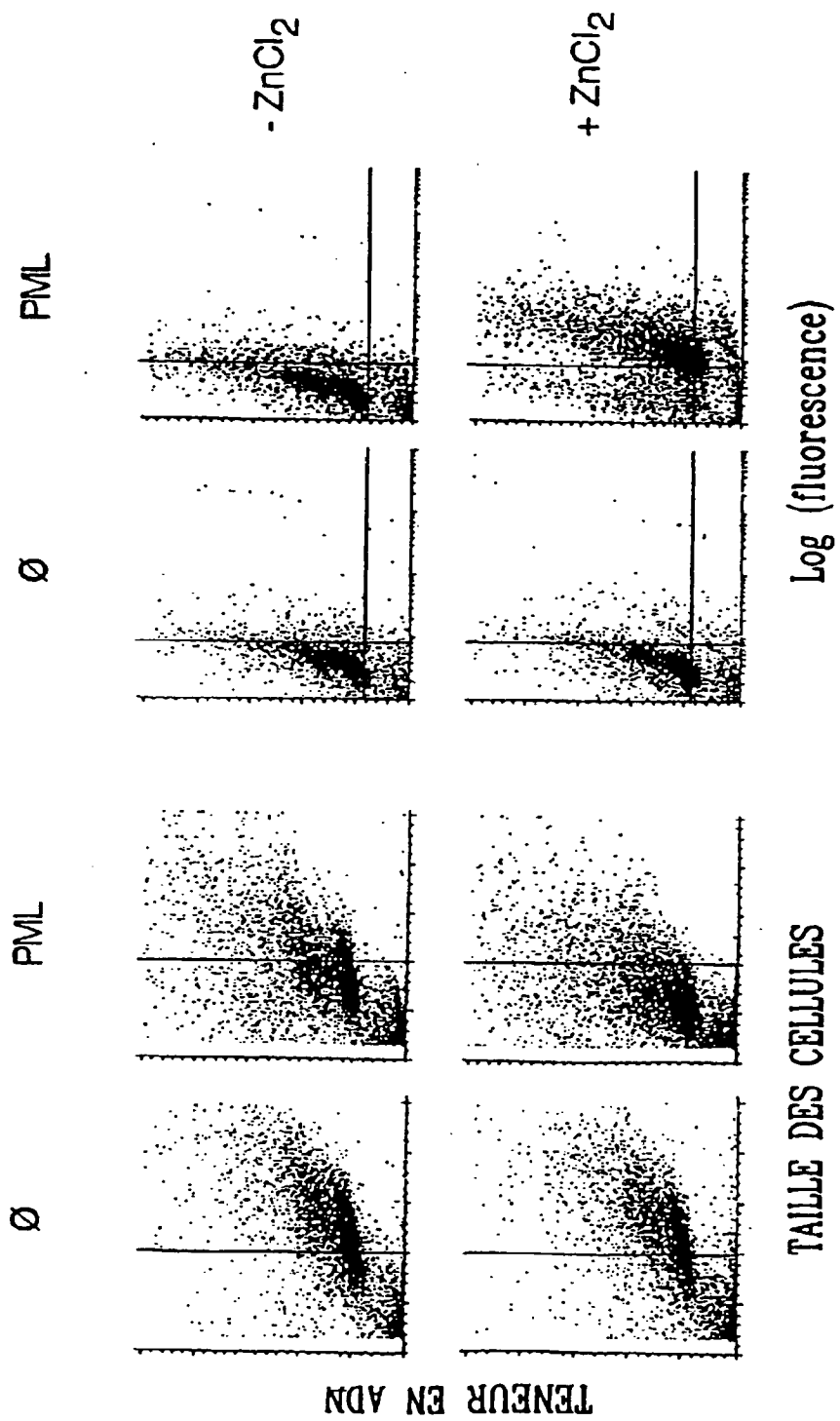
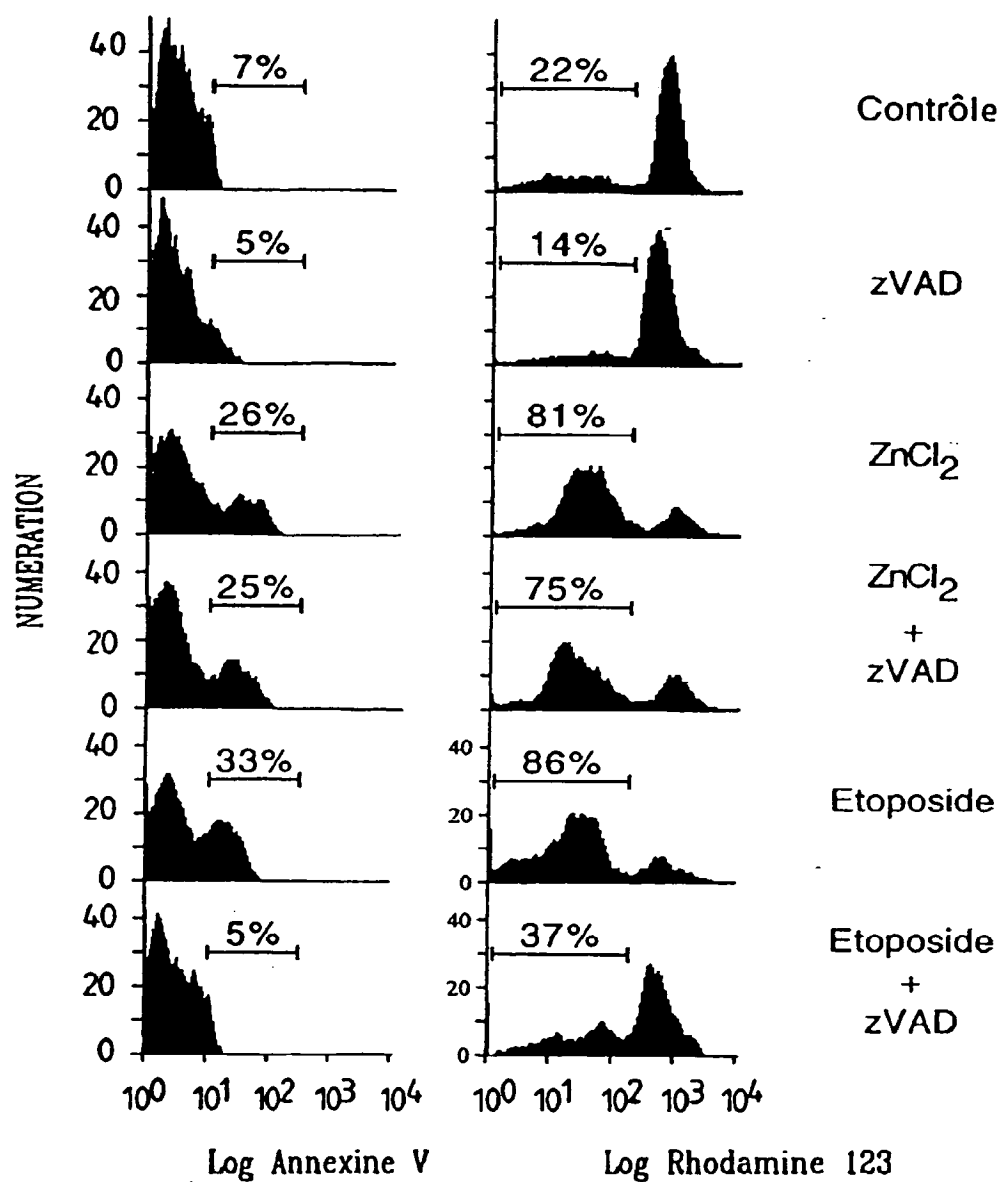
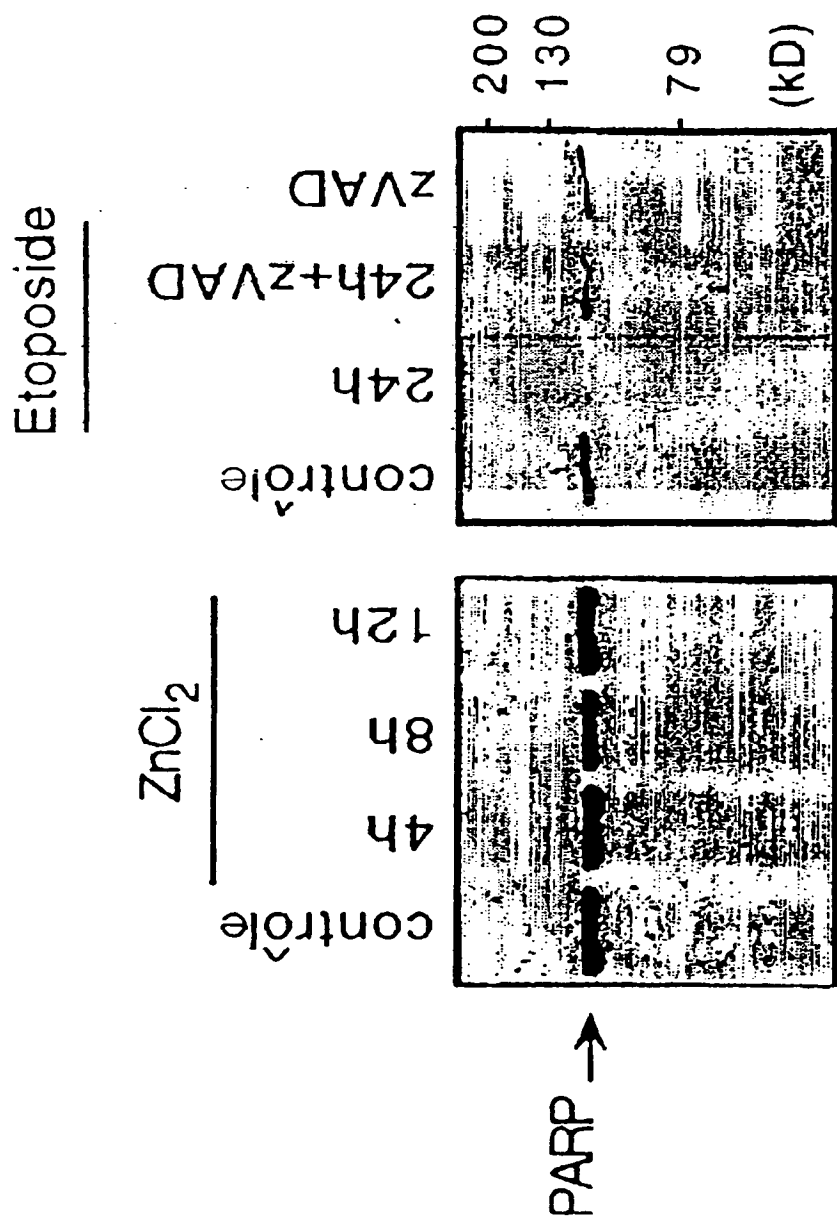


FIG.1B

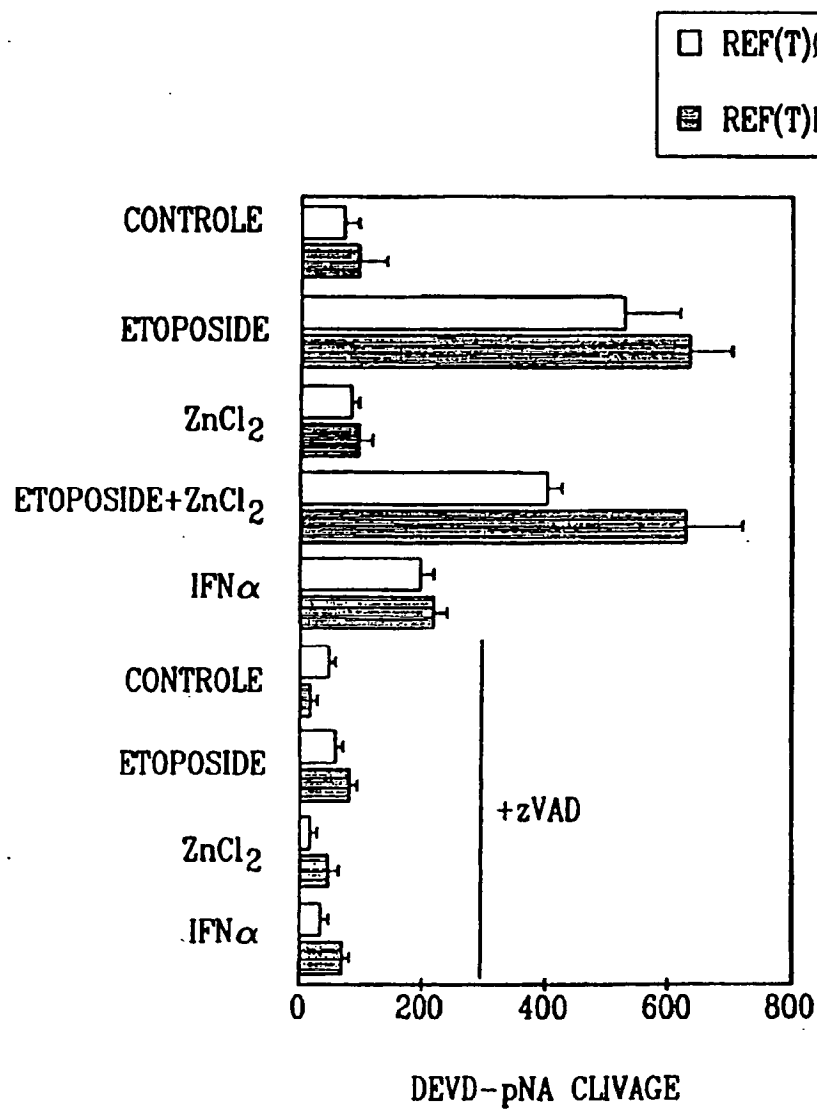
3/7

FIG. 1C

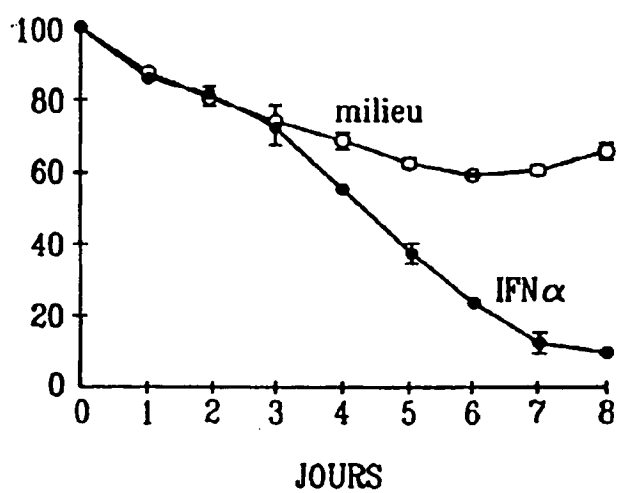
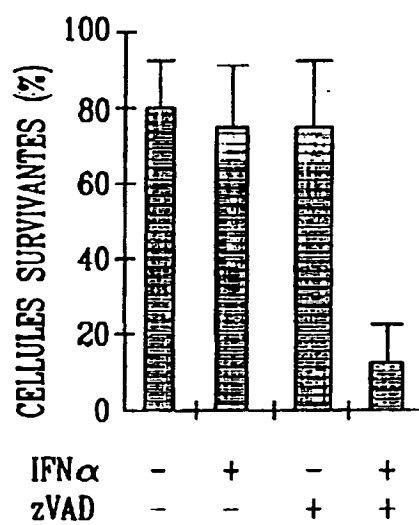
4/7

FIG. 2A

5/7

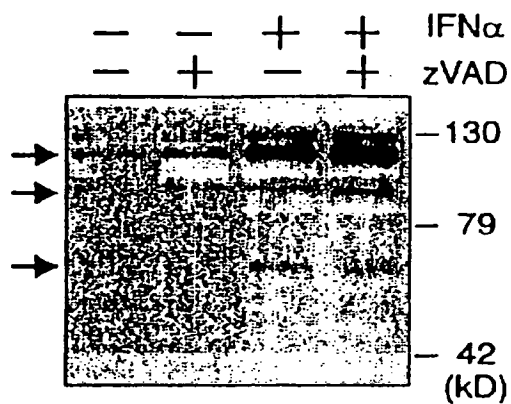
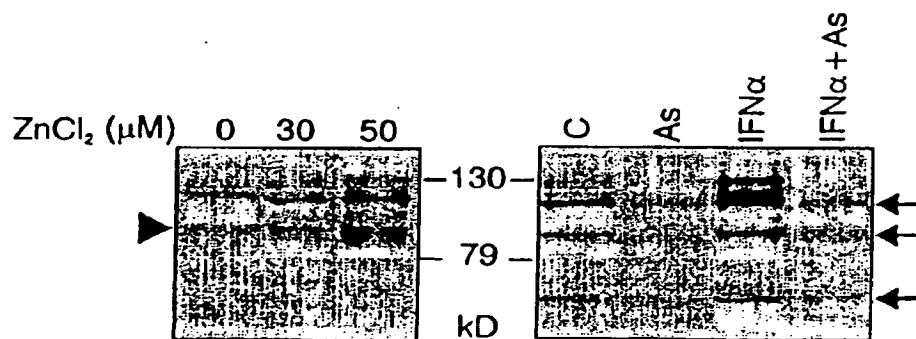
FIG.2B

6/7

FIG.3AFIG.3B



7/7

FIG. 4AFIG. 4B

REPUBLIQUE FRANÇAISE

2781674

INSTITUT NATIONAL  
de la  
PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE  
PRELIMINAIRE  
établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement  
national

FA 564116  
FR 9809886

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	BYRD J.C. ET AL: "Old and new therapies in chronic lymphocytic leukemia: Now is the time for a reassessment of therapeutic goals" SEMINARS IN ONCOLOGY(SEMIN. ONCOL.), 25/1 (65-74), XP002104744 United States * page 71, colonne 1, ligne 15-17 *	1-3,7
X	SOIGNET S ET AL: "Clinical and laboratory studies in leukemia of an organic arsenical, melarsoprol (Meeting abstract)." PROC ANNU MEET AM SOC CLIN ONCOL;16:A10 1997, XP002104745 * le document en entier *	1-3,7
X	KONIG ANDREA (A) ROBERTA: "Comparative activity of melarsoprol and arsenic trioxide in chronic B-cell leukemia lines." BLOOD, 1997, XP002095650 * page 568, colonne 2 - page 569, colonne 1, alinéa 1 *	1-3,7
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 124, no. 23, 3 juin 1996 Columbus, Ohio, US; abstract no. 307527. SLEE, ELIZABETH A. ET AL: "Benzyloxycarbonyl -Val-Ala-Asp (OMe) fluoromethylketone (Z-VAD.FMK) inhibits apoptosis by blocking the processing of CPP32--" XP002104746 * abrégé * & BIOCHEM. J. (1996), 315(1), 21-4 CODEN: BIJOAK;ISSN: 0264-6021,1996.	1-3,6,7
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6)
		A61K
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
3 juin 1999		Leherte, C
<p>CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non écrite P : document intermédiaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons &amp; : membre de la même famille, document correspondant</p>		

1  
EPO FORM 1545 02/92 (P4/C13)

2000-173830/16 B04 CNRS 1998.07.31  
 CNRS CENT NAT RECH SCI \*FR 2781674-A1  
 1998.07.31 1998-009886(+1998FR-009886) (2000.02.04) A61K  
 33/36, 38/21, 38/48, A61P 35/00  
 Use of substances that enhance delivery of promyelocytic leukemia (PML) protein to nuclear bodies and/or enhance stabilization of PML protein to manufacture medicaments for inducing death of undesirable cells  
 C2000-054200  
 Addnl. Data: KOKEN M, QUIGNON F, DE THE H, AMEISEN J C, DE BELS F  
 INSERM INST NAT SANTE & RECH MEDICALE (INRM)

NOVELTY

Substances (I) that enhance delivery of PML protein to nuclear bodies and/or enhance stabilization of PML protein are used to manufacture medicaments for inducing death of undesirable cells, except for acute promyelocytic leukemia cells when the substance is an arsenic compound.

DETAILED DESCRIPTION

INDEPENDENT CLAIMS are also included for the following:

B(4-C1A, 4-N4, 5-B1C, 5-B2B, 14-A1, 14-A2, 14-B2, 14-D7, 14-G3, 14-H1B) .9

- (1) use of at least one substance selected from arsenic compounds, compounds having the same biological properties as arsenic, and caspase inhibitors and/or substrates, to manufacture a medicament for inducing death of undesirable cells, except for acute promyelocytic leukemia cells when the substance is an arsenic compound;
- (2) a process for inducing death of undesirable cells in vitro, comprising contacting the cells with a substance selected from arsenic compounds, compounds having the same biological properties as arsenic, and caspase inhibitors and/or substrates; (3) a pharmaceutical composition containing either:
  - (a) at least one caspase inhibitor and/or substrate in combination with:
    - (i) at least one arsenic compound or compound having the same biological properties as arsenic; and/or
    - (ii) PML protein; and/or
    - (iii) an agent that induces overexpression of PML protein or
  - (b) at least one arsenic compound or compound having the same biological properties as arsenic in combination with:
    - (i) PML protein; and/or

FR 2781674-A+

*V. Act...*

- (ii) an agent that induces overexpression of PML protein;  
 (4) a kit comprising:  
 (a) a pharmaceutical composition containing at least one caspase inhibitor and/or substrate; and/or  
 (b) a pharmaceutical composition containing at least one arsenic compound or compound having the same biological properties as arsenic in combination with  
 (c) a pharmaceutical composition containing PML protein; and/or  
 (d) a pharmaceutical composition containing an agent that induces overexpression of PML protein, the compositions being intended for simultaneous or sequential administration.

#### ACTIVITY

Antitumor; antiviral; antiparasitic; antibacterial; immunomodulatory.

#### MECHANISM OF ACTION

Promoter of PML protein-induced cell death. Incubation of REF(T)PML cells (rat embryonic fibroblasts transformed with SV40T and transfected with pKSmMT-PML) with 1  $\mu$ M arsenic trioxide resulted in 5.5% cell death in the absence of interferon and 63% cell death in the presence of 1000 U/ml interferon  $\alpha$ , compared with

control values of 5% and 42% respectively.

#### USE

(I) can be used to promote PML protein-induced death of tumor cells, cells infected with viruses, parasites or bacteria; immune cells participating in inappropriate immune responses; genetically altered cells, senescent cells or hyperplastic cells. (I) is also used for *ex vivo* treatment of cells susceptible of containing undesirable cells i.e. bone marrow transplants (especially administered to leukemia patients) as there may remain residual malignant cells.

#### ADVANTAGE

No advantages stated in the specification.

#### ADMINISTRATION

Arsenic compounds are preferably administered intravenously at doses of 1-50 mg/day and caspase substrates are preferably administered at doses of 1-250 mg/kg, optionally together with intramuscular or subcutaneous administration of interferon at doses of 1-20 (especially 3-5) million IU every 1-2 days. (I) can be administered simultaneously or sequentially with PML protein and/or

FR 2781674-A+1

2000-173830/16

an agent that induces overexpression of PML protein, especially interferon  $\alpha$  or  $\beta$  (claimed).

EXAMPLE

REF(T)PML cells were treated with  $\text{ZnCl}_2$  and  $10^{-6}$  M  $\text{As}_2\text{O}_3$ , a rapid acceleration in the morphological modifications associated with cell death was observed. The cleavage of DNA was determined using TUNEL tests. The fact that the arsenic increased the induction of cell death in parallel to the localization of PML on the nuclear body suggested that the localization of PML to the nuclear body is important for cell death.

TECHNOLOGY FOCUS






Pharmaceuticals - (I) is preferably arsenic trioxide or zVAD (benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp(O-methyl) fluoromethyl ketone). (26pp367DwgNo.0/4)

FR 2781674-A/2

**USE OF NOVEL AGENTS INDUCING CELL DEATH IN SYNERGY WITH INTERFERONS**

**Patent number:** FR2781674  
**Publication date:** 2000-02-04  
**Inventor:** KOKEN MARCEL; QUIGNON FREDERIQUE; DE THE HUGUES; AMEISEN JEAN CLAUDE; DE BELS FREDERIC  
**Applicant:** INST NAT SANTE RECH MED (FR)  
**Classification:**  
- **international:** A61K33/36; A61K38/21; A61K38/48; A61P35/00  
- **european:** A61K33/36; A61K38/21  
**Application number:** FR19980009886 19980731  
**Priority number(s):** FR19980009886 19980731

**Also published as:**

 WO0007616 (A:  
 WO0007616 (A:  
 EP1100528 (A3  
 EP1100528 (A2  
 EP1100528 (B1

**Report a data error**

**Abstract of FR2781674**

The invention concerns the use of novel agents inducing cell death, and in particular, an agent for overexpression of the PML protein on nuclear bodies, combined with interferons, to induce the death of undesirable cells and stimulate an immune reaction.

---

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ BLACK BORDERS

☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☐ FADED TEXT OR DRAWING

☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**